



Prioritätsbescheinigung über die Einreichung einer Patentanmeldung

Aktenzeichen: 197 38 205.3

Anmeldetag: 2. September 1997

Anmelder/Inhaber: Max-Delbrück-Centrum für Molekulare Medizin,
13125 Berlin/DE

Bezeichnung: Mittel zur Diagnose und zur Therapie von Tumorer-
krankungen

IPC: C 07 K, A 61 K, C 12 Q

Die angehefteten Stücke sind eine richtige und genaue Wiedergabe der ur-
sprünglichen Unterlagen dieser Patentanmeldung.

**CERTIFIED COPY OF
PRIORITY DOCUMENT**

München, den 15. Oktober 2004
Deutsches Patent- und Markenamt
Der Präsident

Im Auftrag



Max-Delbrück-Centrum für Molekulare Medizin

J. Behrens, W. Birchmeier

Mittel zur Diagnose und zur Therapie von Tumorerkrankungen

Zusammenfassung

Die Erfindung betrifft neue Wege zur Bekämpfung von Tumorerkrankungen durch Ausnutzung molekularbiologischer Zusammenhänge bei der Tumorentstehung.

Der Erfindung liegt die Aufgabe zugrunde, ein Verfahren zur Kontrolle der Regulation von β -Catenin in Körperzellen zu entwickeln.

Gegenstand der Erfindung ist ein neues Protein, welches an β -Catenin bindet und zu dessen zytoplasmatischen Abbau führt. Dieses Protein hat die Aminosäuresequenz gemäß Abb. 1 und wurde als CONDUCTIN bezeichnet.

Vom Vorkommen und der Wirkung des Conductins in Körperzellen abgeleitet werden Mittel zur Diagnose und zur Therapie von Tumorerkrankungen entwickelt.

Beschreibung

Die Erfindung betrifft neue Wege zur Bekämpfung von Tumorerkrankungen durch Ausnutzung molekularbiologischer Zusammenhänge bei der Tumorentstehung. Sie betrifft im einzelnen ein Mittel zur Diagnose von Tumorerkrankungen, und darauf aufbauend ein Mittel zur Therapie. Sie betrifft ferner das neue Protein Conductin, seine Mutanten und Varianten sowie Teile davon, die dazu analogen cDNA-Sequenzen und deren Verwendung in gentherapeutischen und pharmakologischen Verfahren.

Anwendungsgebiete der Erfindung sind die Medizin und die pharmazeutische Industrie.

Cadherine und Catenine bilden Zelladhäsionskomplexe, die in zahlreichen Geweben für die Anheftung der Zellen aneinander verantwortlich sind. Die Cadherine sind Transmembranproteine und stellen den direkten Kontakt zwischen benachbarten Zellen her. α -, β - und γ -Catenin sind zytoplasmatische Komponenten, die die Cadherine mit dem Aktin-Zytoskelett verbinden. Neben der Funktion bei der Zelladhäsion haben Catenine auch eine entscheidende Rolle bei Signaltransduktionsprozessen. β -Catenin in Vertebraten und das homologe Segmentpolaritäts-Genprodukt Armadillo in Drosophila werden durch den Wnt/Wingless-Signalweg stabilisiert (Nusse, R., Cell 89, 321-323, 1997). Dies führt zu einer Erhöhung der zytoplasmatischen, nicht an Cadherin gebundenen Fraktion dieser Proteine, die daraufhin mit HMG-Transkriptionsfaktoren der LEF-1/TCF-Familie wechselwirken können. Als Resultat wird β -Catenin/Armadillo in den Zellkern transportiert, wo es zusammen mit den LEF/TCF-Proteinen an DNA bindet und bestimmte Gene aktiviert (Behrens, J. et. al., Nature 382, 638-642, 1997).

Dieser Signalweg spielt auch eine Rolle bei der Tumorentstehung. In Kolonepithelzellen wird der zytoplasmatische Pool von β -Catenin durch das Tumorsuppressor-Genprodukt APC (Adenomatosis Polyposis Coli) streng reguliert. Mutationen von APC, wie sie in

etwa 80% aller Kolonkarzinome auftreten, führen zu verkürzten Formen des APC Proteins, die nicht mehr in der Lage sind β -Catenin zu destabilisieren. Dadurch findet man in diesen Tumoren permanente Komplexe von β -Catenin mit dem HMG-Transkriptionsfaktor TCF-4, welche für die Transformation der Zellen verantwortlich gemacht werden. Diese Theorie wird gestützt durch den kürzlichen Befund, daß in Tumoren, in denen APC nicht verändert ist, Mutationen von β -Catenin auftreten. Diese führen ebenfalls zur zytoplasmatischen Stabilisierung von β -Catenin und zur Assoziation mit LEF-1/TCF-Faktoren (Morin, P.J. et. al., Science 275, 1787-1790).

Die Erfindung hat das Ziel, einen neuen Weg zur Verhinderung der Tumorentstehung zu finden. Der Erfindung liegt die Aufgabe zugrunde, ein Verfahren zur Kontrolle der Regulation von β -Catenin in Körperzellen zu entwickeln.

Gegenstand der Erfindung ist ein neues Protein, welches an β -Catenin bindet und zu dessen zytoplasmatischen Abbau führt. Dieses Protein hat die Aminosäuresequenz gemäß Abb. 1 und wurde als CONDUCTIN bezeichnet.

Die Erfindung beruht nun auf der Erkenntnis, daß Conductin über eine β -Catenin-Bindungsdomäne an β -Catenin und über eine sogenannte RGS-Domäne (Regulator of G-Protein Signalling) an APC-Fragmente bindet. Dadurch kommt es zum zytoplasmatischen Abbau von β -Catenin und in Vertebraten zur Blockade des Wnt/Wingless-Signalwegs. Damit ist klar, daß Conductin ein wichtiger Regulator der β -Catenin-Funktion ist und im Zusammenspiel mit APC zur Tumorsuppression beiträgt.

Davon abgeleitet betrifft die Erfindung ein Mittel zur Diagnose von Tumorerkrankungen, welches dadurch gekennzeichnet ist, daß das Vorhandensein und die Menge von Conductin, seiner Mutanten und Varianten oder seiner Teile in Körperzellen nachgewiesen wird. Dieser Nachweis kann auf der Proteinebene mit spezifischen Antikörpern durchgeführt werden, speziell mit monoklonalen

Antikörpern.

Die Diagnose von Tumorerkrankungen kann gemäß der Erfindung auch auf der Genebene erfolgen. Dazu werden mit ausgewählten Primern und cDNA-Sonden, die aus der Gensequenz des Conductins abgeleitet sind,

- das Gen, das für Conductin, seine Mutanten und Varianten oder Teile davon kodiert, bzw.
- mRNA-Sequenzen, die von diesen Genen abgelesen werden, nachgewiesen.

Das erfindungsgemäße Mittel zur Therapie von Tumorerkrankungen enthält Substanzen, die die Wirkung des Conductins im Körper aktivieren/reaktivieren. Das sind vor allem Mittel, die den Genpromoter des Conductins aktivieren bzw. Mittel, die die Stabilität der von den Conductin-Genen abgeleiteten m-RNA-Sequenzen erhöht. Das Hauptziel aller dieser Mittel besteht erfindungsgemäß darin, die Aktivität des Conductins in den Körperzellen zu erhöhen. Dazu kommen u. a. kleinmolekulare Substanzen in Betracht, die z. B. durch High-Througput-Number-Screening gefunden werden.

Die Erfindung umfaßt auch gentherapeutische Mittel, enthaltend Gene, die für Conductin, seine Mutanten und Varianten oder Teile davon kodieren, bzw. mRNA-Sequenzen, die von diesen Genen abgelesen werden.

Unter Schutz gestellt wird ferner das neue Protein Conductin gemäß Abb. 1, seine Mutanten und Varianten sowie Teile davon. Besonders bevorzugte Teilsequenzen sind die Aminosäuren 78-200 (RGS), 343-464 (β -Catenin-Bindungsdomäne) und 782-832 (Dishevelled Homologie-Region). Zum Schutzzumfang gehören auch Teilsequenzen des Adenomatosis Poliposis Coli (APC), gekennzeichnet durch die Aminosäuresequenzen 1464-1604, 1516-1595, 1690-1778 und 1995-2083 als RGS-Domänen-Interaktionsorte.

Gleichermaßen beansprucht werden die analogen cDNA-Sequenzen,

insbesondere die volle cDNA-Sequenz des Conductins (Basenpaare 1-3197) gemäß Abb. 2 sowie die Teilsequenzen des Conductins der Nukleotidfolge 452-820 (RGS-Genabschnitt), der Nukleotidfolge 1247-1612 (Genabschnitt der β -Catenin-Bindungsdomäne) und der Nukleotidfolge 2564-2716 (Genabschnitt der Dishevelled Homologie-Region)

Die Erfindung wird durch die folgenden Ausführungsbeispiele näher erläutert.

Conductin wurde durch einen Hefe 2-Hybrid Screen als β -Catenin-Interaktionspartner identifiziert. Die vollständige cDNA-Sequenz wurde daraufhin isoliert und sequenziert. Die abgeleitete Aminosäuresequenz von Conductin ist in Abb. 1 gezeigt, die Nukleotidsequenz in Abb. 2 und die Gegenüberstellung von Aminosäure- und Nukleotidsequenz in Abb. 3. Conductin besteht aus 839 Aminosäuren und hat ein Molekulargewicht von 92,4 kDa. Durch Sequenzvergleiche wurde im Conductin eine RGS-Domäne (Aminosäuren 78-200) und eine zu dem Protein Dishevelled verwandte Domäne (Aminosäuren 782-832, Dishevelled Homologie-Region) identifiziert (Abb. 1-3). Die β -Catenin-Bindungsdomäne (Aminosäuren 343-464) wurde durch Interaktionsstudien im 2-Hybrid-System entdeckt (Abb. 4). Es zeigte sich, daß diese Domäne ausreichend und notwendig für die Bindung an β -Catenin ist (Abb. 4), wohingegen die RGS- und Dishevelled Homologie-Region nicht beteiligt sind. Die Wechselwirkung von Conductin mit β -Catenin wurde auch in Co-Immunpräzipitationsexperimenten biochemisch bewiesen.

Die Wirkung von Conductin auf β -Catenin wurde in SW480 Zellen untersucht. In diesen Zellen ist das Tumor-Suppressor-Genprodukt APC mutiert, wodurch es zu einem Anstieg des cytoplasmatischen und vor allem nukleären Gehalts von β -Catenin kommt. Die Einbringung von Conductin in diese Zellen führt zu einem drastischen Abbau von β -Catenin, wodurch die Zelle von cytoplasmatischem und im Zellkern befindlichen β -Catenin depletiert wird (Abb. 4). Diese Wirkung auf den Gehalt β -Catenin

ist gleich stark wie die von nichtmutiertem APC, woraus geschlossen werden kann, daß Conductin ebenfalls als Tumorsuppressor durch Regulation von β -Catenin wirkt. Es wurde außerdem gezeigt, daß Conductin den Wnt/Wingless-Signalweg auch in Xenopus-Embryonen durch seine Wirkung auf β -Catenin hemmt.

Es wurde außerdem festgestellt, daß Conductin mit APC direkt interagiert. APC-Fragmente von Aminosäure 1464-1604, 1516-1595, 1690-1778 und 1995-2883 wurden als Interaktionsstellen für Conductin identifiziert. In Conductin erfolgt die Bindung an APC über die RGS-Domäne; dieser Bereich ist ausreichend und notwendig für die Interaktion. Die anderen Domänen in Conductin sind nicht beteiligt (Abb. 5).

Legende zu den Abbildungen:

Abb. 1 Aminosäuresequenz von Conductin

Die Conductin cDNA kodiert ein Protein von 839 Aminosäuren mit einem berechneten Molekulargewicht von 92,4 kDa. Die RGS-Domäne (doppelt unterstrichen), die β -Catenin-Bindungsdomäne (einfach unterstrichen) und die Dishevelled Homologie-Region sind durch Fettdruck hervorgehoben.

Abb. 2 Nukleotidsequenz von Conductin von Position 1-3199

Die Sequenzbereiche sind analog zu Abb.1 markiert.

Abb. 3 Gegenüberstellung von Aminosäure- und Nukleotidsequenz von Conductin

Abb. 4 Analyse der Interaktion von Conductin und seinen Teilen mit β -Catenin

Das Conductin Protein und abgeleitete Teilstücke sind schematisch dargestellt. Hervorgehoben sind die RGS-Domäne (RGS) und die β -Catenin-Bindungsstelle (β -BD). Die Interaktion mit β -Catenin wurde im Hefe 2-Hybrid Assay untersucht und als β -Galaktosidase Einheiten quantifiziert. Man erkennt, daß die Bindung an β -Catenin auf die β -Catenin-Bindungsstelle beschränkt ist, die anderen Teile des Proteins tragen dazu nicht bei. Der Abbau von β -Catenin in SW480 Zellen durch Conductin wurde nach transienter Expression der angegebenen Proteine und Immunfluoreszenz-Färbung von β -Catenin analysiert. Nur Teilstücke von Conductin, die an β -Catenin binden, führen zu dessen Abbau.

Abb. 5 Analyse der Bindung von Conductin und seinen Teilen an APC

Die Bindung der APC Fragmente von Aminosäure 1464-1604 (APCfr.1)

und 1516-1595 (APCfr. 2) an Conductin und abgeleitete Teilstücke wurden im Hefe 2-Hybrid Assay untersucht und als β -Galaktosidase Einheiten quantifiziert. Die Analyse zeigt die ausschließliche Interaktion von APC mit der RGS-Domäne von Conductin. Vergleichbare Ergebnisse für die Bindung an die RGS-Domäne wurden mit APC Fragmenten von Aminosäure 1690-1778 und 1995-2883 erhalten.

Patentansprüche

1. Mittel zur Diagnose von Tumoren, enthaltend eine Substanz, mit der
 - Conductin, seine Mutanten und Varianten oder Teile davon bzw.
 - Gene, die für Conductin, seine Mutanten und Varianten oder Teile davon kodieren, bzw.
 - m-RNA-Sequenzen, die von diesen Genen abgelesen werden, nachgewiesen werden.
2. Mittel zur Diagnose von Tumoren nach Anspruch 1, enthaltend spezifische Antikörper gegen Conductin, seine Varianten oder Mutanten oder Teile davon.
3. Mittel zur Diagnose von Tumoren nach Anspruch 1 und 2, dadurch gekennzeichnet, daß die spezifischen Antikörper monoklonale Antikörper sind.
4. Mittel zur Diagnose von Tumoren nach Anspruch 1, enthaltend korrespondierende Oligonukleotid-Primer bzw. DNA-Sonden zum Nachweis der Gene und deren Mutationen.
5. Mittel zur Diagnose von Tumoren nach Anspruch 1, enthaltend korrespondierende Oligonukleotid-Primer bzw. DNA-Sonden zum Nachweis der RNA-Sequenzen.
6. Mittel zur Therapie von Tumoren, enthaltend eine Substanz, die die Wirkung des Conductins im Körper aktiviert/reaktiviert.
7. Mittel nach Anspruch 6, enthaltend eine Substanz, die den Genpromoter des Conductins aktiviert.
8. Mittel nach Anspruch 6, enthaltend eine Substanz, die die Stabilität der mRNA-Sequenzen erhöht.
9. Mittel nach Anspruch 6, enthaltend eine Substanz, die die

Aktivität des Conductins erhöht.

10. Conductin, seine Varianten und Mutanten sowie Teile davon.

11. Conductin nach Anspruch 10, gekennzeichnet durch die Aminosäuresequenz 1-839 gemäß Abb. 1, wobei Abb. 1 Bestandteil dieses Anspruchs ist.

12. Teilsequenz des Conductins nach Anspruch 10, gekennzeichnet durch die Aminosäuresequenz 78-200 (RGS-Domäne) der Abb. 1.

13. Teilsequenz des Conductins nach Anspruch 10, gekennzeichnet durch die Aminosäuresequenz 343-464 (β -Catenin-Bindungsdomäne) der Abb. 1.

14. Teilsequenz des Conductins nach Anspruch 10, gekennzeichnet durch die Aminosäuresequenz 782-832 (Dishevelled Homologie-Region) der Abb. 1.

15. Teilsequenzen des Adenomatosis Poliposis Coli (APC), gekennzeichnet durch die Aminosäuresequenzen 1464-1604, 1516-1595, 1690-1778 und 1995-2083 als RGS-Domänen-Interaktionsorte.

16. cDNA-Sequenz von Conductin, seiner Varianten oder Mutanten oder Teilen davon.

17. cDNA-Sequenz des Conductins der Nukleotidfolge 1-3197 der Abb. 2, wobei Abb. 2 Bestandteil dieses Anspruchs ist.

18. cDNA-Teilsequenz des Conductins der Nukleotidfolge 452-820 (RGS-Genabschnitt) der Abb. 2.

19. cDNA-Teilsequenz des Conductins der Nukleotidfolge 1247-1612 (Genabschnitt der β -Catenin-Bindungsdomäne) der Abb. 2.

20. cDNA-Teilsequenz des Conductins der Nukleotidfolge 2564-2716 (Genabschnitt der Dishevelled Homologie-Region) der Abb. 2.

21. Verwendung des Conductin-Gens für die Gentherapie von Tumorerkrankungen, dadurch gekennzeichnet, daß ein Vektor mit dem Conductin-Gen konstruiert wird, anschließend ein Gentransfer in den menschlichen Körper erfolgt und damit die Aktivität des Conductins in Körperzellen wiederhergestellt wird.

MSSAVLVTL L P D P S S S F R E D A P R P P V P G E E G E T P P C Q P S V G K V Q S T K P M P V S S N A R R N E D 60
 G L G E P E G R A S P D S P L T R W T K S L H S L L G D Q D G A Y L F R T F L E R E K C V D T L D F W F A C N G F R O M 120
N L K D T K T L R V A K A I Y K R Y I E N N S V V S K O L K P A T K T Y I R D G I K K Q Q I G S V M F D Q A Q T E I Q A 180
V M E E N A Y Q V F L T S D I Y L E Y V R S G G E N T A Y M S N G G L G S L K V L C G Y L P T L N E E E E W T C A D L K 240
 C K L S P T V V G L S S K T L R A T A S V R S T E T A E N G F R S F K R S D P V N P Y H V G S G Y V F A P A T S A N D S 300
 E L S S D A L T D D S M S M T D S S V D G V P P Y R M G S K K Q L Q R E M H R S V K A N G Q V S L P H F P R T H R L P K 360
E M T P V E P A A F A A E L I S R L E K L K L E L E S R H S L E E R L Q Q I R E D E E K E G S E Q A L S S R D G A P V Q 420
H P L A L L P P A A M K R T H K P F W T T T S P G S S R P P A V N P L V W V A I A H G P A P P T T T T S T T T I S S V I 480
 P F F R L G A S C P V A A C P L L G G K S F L T K Q T T K H V H H H Y I H H H A V P K T K E E I E A E A T Q R V R C L C 540
 P G G T D Y Y C Y S K C K S H P K A P E P L P G E Q F C G S R G G T L P K R N A K G T E P G L A L S A R D G G M S S A A 600
 G G P Q L P G E E G D R S Q D V W Q W M L E S E R Q S K S K P H S A Q S I R K S Y P L E S A R A A P G E R V S R H H L L 660
 G A S G H S R S V A R A H P F T Q D P A M P P L T P P N T L A Q L E E A C R R L A E V S K P Q K Q R C C V A S Q Q R D R 720
 N H S A A G Q A G A S P F A N P S L A P E D H K E P K K L A S V H A L Q A S E L V V T Y F F C G E E I P Y R R M L K A Q 780
 S L T L G H F K E Q L S K K G N Y R Y Y F K K A S D E F A C G R V F E E I W D D E T V L P M Y E G R I L G K V E R I D 839

AAATAAGCAGCCGTTTCGCGATGGATTTCTGGGGCCACCCTGGAGGCCGAGGCGTCCGCTCCC 60
 CAAAGGAGAGCTTTGCTGTAAAAGAGAGGAGGCTCACATGAGCCCCCTGCTGACTTAAGAG 120
 AGACCAAGCCGATTGCTGAGAGGAAC TGAAGAAGAAAAAGGAGGAGGAGGAAAAAAG 180
 CAAAACAAAATCCAACTCAGTGAGACGCTCTCCCTCACCATGAGTAGCGCCGTGTTAGT 240
 GACTCTCCTTCCAGATCCCAGCAGCAGCTTCCGCGAGGATGCTCCGCGGCCCGCGGTTCC 300
 GGGAGAAGAAGGGGAGACCCACCGTGTCAGCCTAGTGTGGGCAAGGTCCAGTCCACCAA 360
 ACCTATGCCCCGTTTCTCTAATGCTAGGCGGAATGAAGATGGACTGGGGGAGCCCCGAGG 420
 GCGGGCCTCCCCCGATTCCCTTTGACCAGGTGGACCAAGTCTTTACACTCCTTGTTGGG 480
TGACCAGGATGGTGCATACCTCTTCCGGACTTTCTCGGAGAGGGAGAAAATGTGTGGATAC 540
GCTGGACTTCTGGTTTCTGTTGTAATGGGTTTCAGGCAGATGAACCTGAAGGATACCAAAAC 600
TTTGGCAGTGGCCAAAGCAATCTATAAGAGGTACATTGAGAACAACAGCGTTGTCTCCAA 660
GCAGCTGAAGCCCGCCACCAAGACCTACATACGAGATGGCATCAAGAAGCAACAGATCGG 720
CTCGGTCATGTTTGACCAGGCACAGACCCGAGATCCAGGCAGTGATGGAGGAAAATGCCTA 780
CCAGGTGTTCTTGACTTCTGACATTTACCTGGAATATGTGAGGAGTGGGGGGGAAAACAC 840
 AGCTTACATGAGTAACGGGGGACTGGGGAGCCTAAAGGTCTTATGTGGCTACCTCCCCAC 900
 CTTGAATGAAGAAGAGGAGTGGACGTGTGCCGACCTCAAGTGCAAACCTCTCACCCACCGT 960
 GGTGGCTTGTCCAGCAAACTCTTCGGGCCACCGCGAGTGTGAGATCCACGGAAACAGC 1020
 TGAAAACGGATTTCAGGTCTTCAAGAGAAGCGACCCAGTCAATCCTTATCACGTAGGTTT 1080
 CGGCTATGTCTTTGCACCAGCCACCAAGTGCACACGACAGCGAGTTATCCAGCGACGCT 1140
 GACCGACGATTCATGTCCATGACGAGCAGTAGCGTAGATGGAGTCCCTCCTTACCGCAT 1200
 GGGGATGAAGAAACAACCTCCAGAGAGAGATGCATCGCAGTGTGAAGGCCAATGGCCAAGT 1260
 GTCTCTACCTCATTTTTCCGAGAACCCACCGCTGCCCAAGGAGATGACGCTGTGGAACC 1320
 TGCTGCCTTCGCCCGCCGAGCTCATCTCCAGGCTGGAGAACTGAACTGGAGCTGGAAAG 1380
 CCGCCATAGTCTGGAGGAGCGGCTGCAGCAGATCCGGGAGGATGAAGAAAAGGAGGGGTC 1440
 TGAGCAGGCCCTGAGCTCACGGGATGGAGCACCGGTCCAGCACCCCCTGGCCCTCCTACC 1500
 TCCGGCAGCTATGAAGAGGACCCACAAACCATTTTGGACGACCACCTCTCCAGGGTCCCTC 1560
 AAGACCCCCGGCTGTCAATCCCCTGGTGTGGGTCGCTATAGCCCACGGTCCCGCTCCCC 1620
 GACCACCACCAGCACCACCATGAGCAGTGTCTATACCCTTCTTTTCGACTGGGGGC 1680
 AAGCTGCCCCGTGGCTGCTTGGCCCCCTCCTTGGAGGCAAGAGCTTCTTGACCAACAGAC 1740
 GACGAAGCACGTTTACCACCCTACATCCACCACCACGCCGTCCCCAAGACCAAGGAGGA 1800
 GATCGAGGCAGAAGCCACACAGAGAGTCCGCTGCCTCTGTCTGGGGGAACAGATTATTA 1860
 TTGCTACTCCAAATGCAAAAGCCACCCGAAGGCTCCAGAGCCCCCTGCCTGGGGAGCAGTT 1920
 TTGTGGCAGCAGAGGTGGTACCTTGCCAAAACGGAATGCAAGGGGCACCGAACCAGGCT 1980
 TGCATGTTCGGCCAGGGATGGAGGGATGTCCAGTGCAGCGGGGGGCCCCCAGCTTCTTG 2040
 GGAAGAAGGAGACCGGTACAGGATGTCTGGCAGTGGATGTTAGAGAGTGAGCGGCAGAG 2100
 CAAGTCCAAGCCCCATAGTGCCCAAAGCATAAGAAAGAGCTACCCATTGGAGTCTGCCCC 2160
 TGCGGCCCCAGGAGAACGAGTCAGCCGGCACCATCTGTTGGGGGCCAGCGGACACTCCCG 2220
 CTCGGTGGCCCCGGGCTCACCCATTTACCCAGGACCCCTGCAATGCCTCCCCTTACCCACC 2280
 CAACACTTTGGCACAGCTAGAGGAAGCCTGCCGAGGCTGGCAGAGGTGTGGAAGCCCCA 2340
 GAAGCAGCGGTGCTGCGTGGCCAGTCAGCAGAGGGACAGGAACCACTCGGCTGCTGGTCA 2400
 GGCAGGAGCCCTACCCCTTCGCCAACCCAAAGCCTGGCTCCAGAAGATCACAAAGAGCCAAA 2460
 GAAACTGGCAAGTGTCCACGCGCTCCAGGCCAGTGAGCTGGTTGTACCTACTTTTCTG 2520
 TGGAGAAGAAATTCCATACAGGAGGATGCTGAAGGCTCAAAGCTTGACCCTGGGCCACTT 2580
 CAAGGAGCAGCTCAGCAAAAAGGGAAATTACAGGTATTATTTCAAGAAGGCGAGTGACGA 2640
 ATTTGCCTGCGGACGAGTTTTTTGAGGAGATCTGGGACGACGAGACAGTGCTCCCCATGTA 2700
 CGAAGGCAGGATCCTGGGCAAAGTGGAGAGGATCGACTGAGCCTTGGCCTCCTCGGCGTG 2760
 CAACCTGGGCAAGCACCTCGGCGTGACCATGGAGCCGAAGGCCAGAGACCCTGTCTCAG 2820
 GCCTACGCAACAGCCACGAAATATTCTGAAGGAAAATGAAACCAATTAAGAAGACAAAGC 2880
 CTAGGGAGGGGACTGGCGCCTGGGCCTTCAGGAGGGCGGGGTATGTTGATCTTCAGTCTC 2940
 CAGGAGCCTGGGTACCGAGATGAGAAAGCCTGAACTATTTATTAACATGACCACTCTG 3000
 GGCTATAGAAGATGCTCAGTGTGTTTGAAGAGACTGACATACATAATAGATGACTTCTAG 3060
 GGTCTGAAATTCATAGACTAAGAGAAAACCTGTGTATAGCTTGGCCGCACAGGAGTCTT 3120
 ACTGATATTTATTGAACAGTCGATTCCCCCTACCCGCTCCCTACCCCCCGCCCCGAGT 3180
 TTATGCTGCTTTAAAC 3197

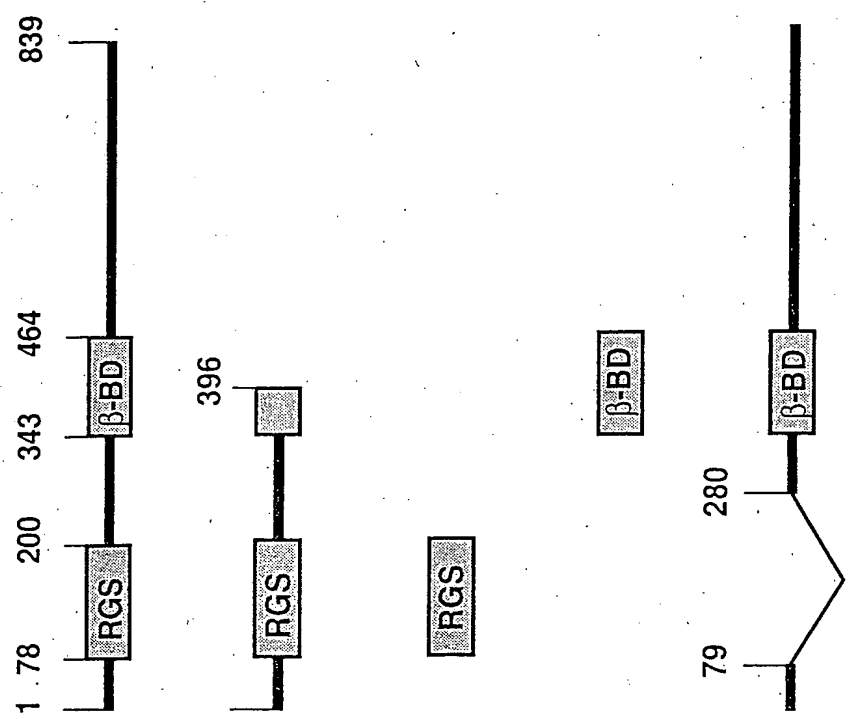
1	5'-AAATAAGCAGCCGTTTCGCGATGGATTTCGGGGCCACCCGGAGGCCGAGGCGTCCGCTCCCCAAAGG	66
67	AGAGCTTTGCTGTAAAAGAGAGGAGGCTCACATGAGCCCCTGCTGACTTAAGAGAGACCAAGC	129
130	CGATTGCTGAGAGGAACTGGAAGAAGAAAAAGGAGGAGGAGGAAAAAAGCAAAACAAAATC	192
193	CAAACCTCAGTGAGACGCTCTCCCTCACCATG AGT AGC GCC GTG TTA GTG ACT CTC	247
1	M S S A V L V T L	9
248	CTT CCA GAT CCC AGC AGC AGC TTC CGC GAG GAT GCT CCG CGG CCC CCG	295
10	L P D P S S S F R E D A P R P P	25
296	GTT CCG GGA GAA GAA GGG GAG ACC CCA CCG TGT CAG CCT AGT GTG GGC	343
26	V P G E E G E T P P C Q P S V G	41
344	AAG GTC CAG TCC ACC AAA CCT ATG CCC GTT TCC TCT AAT GCT AGG CGG	391
42	K V Q S T K P M P V S S N A R R	57
392	AAT GAA GAT GGA CTG GGG GAG CCC GAG GGG CGG GCC TCC CCC GAT TCC	439
58	N E D G L G E P E G R A S P D S	73
440	CCT TTG ACC AGG TGG ACC AAG TCT TTA CAC TCC TTG TTG GGT GAC CAG	487
74	P L T R W T K S L H S L L G D Q	89
488	GAT GGT GCA TAC CTC TTC CGG ACT TTC CTG GAG AGG GAG AAA TGT GTG	535
90	D G A Y L F R T F L E R E K C V	105
536	GAT ACG CTG GAC TTC TGG TTT GCT TGT AAT GGG TTC AGG CAG ATG AAC	583
106	D T L D F W F A C N G F R O M N	121
584	CTG AAG GAT ACC AAA ACT TTG CGA GTG GCC AAA GCA ATC TAT AAG AGG	631
122	L K D T K T L R V A K A I Y K R	137
632	TAC ATT GAG AAC AAC AGC GTT GTC TCC AAG CAG CTG AAG CCC GCC ACC	679
138	Y I E N N S V V S K Q L K P A T	153
680	AAG ACC TAC ATA CGA GAT GGC ATC AAG AAG CAA CAG ATC GGC TCG GTC	727
154	K T Y I R D G I K K O O I G S V	169
728	ATG TTT GAC CAG GCA CAG ACC GAG ATC CAG GCA GTG ATG GAG GAA AAT	775
170	M F D O A O T E I O A V M E E N	185
776	GCC TAC CAG GTG TTC TTG ACT TCT GAC ATT TAC CTG GAA TAT GTG AGG	823
186	A Y O V F L T S D I Y L E Y V R	201
824	AGT GGG GGG GAA AAC ACA GCT TAC ATG AGT AAC GGG GGA CTG GGG AGC	871
202	S G G E N T A Y M S N G G L G S	217
872	CTA AAG GTC TTA TGT GGC TAC CTC CCC ACC TTG AAT GAA GAA GAG GAG	919
218	L K V L C G Y L P T L N E E E E	233
920	TGG ACG TGT GCC GAC CTC AAG TGC AAA CTC TCA CCC ACC GTG GTT GGC	967
234	W T C A D L K C K L S P T V V G	249
968	TTG TCC AGC AAA ACT CTT CGG GCC ACC GCG AGT GTG AGA TCC ACG GAA	1015
250	L S S K T L R A T A S V R S T E	265
1016	ACA GCT GAA AAC GGA TTC AGG TCC TTC AAG AGA AGC GAC CCA GTC AAT	1063
266	T A E N G F R S F K R S D P V N	281
1064	CCT TAT CAC GTA GGT TCC GGC TAT GTC TTT GCA CCA GCC ACC AGT GCC	1111
282	P Y H V G S G Y V F A P A T S A	297
1112	AAC GAC AGC GAG TTA TCC AGC GAC GCA CTG ACC GAC GAT TCC ATG TCC	1159
298	N D S E L S S D A L T D D S M S	313
1160	ATG ACG GAC AGT AGC GTA GAT GGA GTC CCT CCT TAC CGC ATG GGG AGT	1207
314	M T D S S V D G V P P Y R M G S	329
1208	AAG AAA CAA CTC CAG AGA GAG ATG CAT CGC AGT GTG AAG GCC AAT GGC	1255
330	K K Q L Q R E M H R S V K A N G	345
1256	CAA GTG TCT CTA CCT CAT TTT CCG AGA ACC CAC CGC CTG CCC AAG GAG	1303
346	Q V S L P H F P R T H R L P K E	361
1304	ATG ACG CCT GTG GAA CCT GCT GCC TTC GCC GAG CTC ATC TCC AGG	1351
362	M T P V E P A A F A A E L I S R	377
1352	CTG GAG AAA CTG/AAA CTG GAG CTG GAA AGC CGC CAT AGT CTG GAG GAG	1399
378	L E K L K L E L E S R H S L E E	393
	<i>PstI</i> V	
1400	CGG CTG CAG CAG ATC CGG GAG GAT GAA GAA AAG GAG GGG TCT GAG CAG	1447
394	R L Q Q I R E D E E K E G S E Q	409
1448	GCC CTG AGC TCA CGG GAT GGA GCA CCG GTC CAG CAC CCC CTG GCC CTC	1495
410	A L S S R D G A P V Q H P L A L	425
1496	CTA CCT CCG GCA GCT ATG AAG AGG ACC CAC AAA CCA TTT TGG ACG ACC	1543
426	L P P A A M K R T H K P F W T T	441

1544	ACC	TCT	CCA	GGG	TCC	TCA	AGA	CCC	CCG	GCT	GTC	AAT	CCC	CTG	GTG	TGG	1591
442	T	S	P	G	S	S	R	P	P	A	V	N	P	L	V	W	457
1592	GTC	GCT	ATA	GCC	CAC	GGT	CCC	GCT	CCC	CCG	ACC	ACC	ACC	ACC	AGC	ACC	1639
458	V	A	I	A	H	G	P	A	P	P	T	T	T	T	S	T	473
1640	ACC	ACC	ATC	AGC	AGT	GTC	ATA	CCC	TTC	TTT	CGA	CTG	GGG	GCA	AGC	TGC	1687
474	T	T	I	S	S	V	I	P	F	F	R	L	G	A	S	C	489
1688	CCC	GTG	GCT	GCT	TGC	CCC	CTC	CTT	GGA	GGC	AAG	AGC	TTC	CTG	ACC	AAA	1735
490	P	V	A	A	C	P	L	L	G	G	K	S	F	L	T	K	505
1736	CAG	ACG	ACG	AAG	CAC	GTT	CAC	CAC	CAC	TAC	ATC	CAC	CAC	CAC	GCC	GTC	1783
506	Q	T	T	K	H	V	H	H	H	Y	I	H	H	H	A	V	521
1784	CCC	AAG	ACC	AAG	GAG	GAG	ATC	GAG	GCA	GAA	GCC	ACA	CAG	AGA	GTC	CGC	1831
522	P	K	T	K	E	E	I	E	A	E	A	T	Q	R	V	R	537
1832	TGC	CTC	TGT	CCT	GGG	GGA	ACA	GAT	TAT	TAT	TGC	TAC	TCC	AAA	TGC	AAA	1879
538	C	L	C	P	G	G	T	D	Y	Y	C	Y	S	K	C	K	553
1880	AGC	CAC	CCG	AAG	GCT	CCA	GAG	CCC	CTG	CCT	GGG	GAG	CAG	TTT	TGT	GGC	1927
554	S	H	P	K	A	P	E	P	L	P	G	E	Q	F	C	G	569
1928	AGC	AGA	GGT	GGT	ACC	TTG	CCA	AAA	CGG	AAT	GCA	AAG	GGC	ACC	GAA	CCG	1975
570	S	R	G	G	T	L	P	K	R	N	A	K	G	T	E	P	585
1976	GGT	CTT	GCA	CTG	TCG	GCC	AGG	GAT	GGA	GGG	ATG	TCC	AGT	GCA	GCG	GGG	2023
586	G	L	A	L	S	A	R	D	G	G	M	S	S	A	A	G	601
2024	GGC	CCC	CAG	CTT	CCT	GGG	GAA	GAA	GGA	GAC	CGG	TCA	CAG	GAT	GTC	TGG	2071
602	G	P	Q	L	P	G	E	E	G	D	R	S	Q	D	V	W	617
2072	CAG	TGG	ATG	TTA	GAG	AGT	GAG	CGG	CAG	AGC	AAG	TCC	AAG	CCC	CAT	AGT	2119
618	Q	W	M	L	E	S	E	R	Q	S	K	S	K	P	H	S	633
2120	GCC	CAA	AGC	ATA	AGA	AAG	AGC	TAC	CCA	TTG	GAG	TCT	GCC	CGT	GCG	GCC	2167
634	A	Q	S	I	R	K	S	Y	P	L	E	S	A	R	A	A	649
2168	CCA	GGA	GAA	CGA	GTC	AGC	CGG	CAC	CAT	CTG	TTG	GGG	GCC	AGC	GGA	CAC	2215
650	P	G	E	R	V	S	R	H	H	L	L	G	A	S	G	H	665
2216	TCC	CGC	TCG	GTG	GCC	CGG	GCT	CAC	CCA	TTT	ACC	CAG	GAC	CCT	GCA	ATG	2263
666	S	R	S	V	A	R	A	H	P	F	T	Q	D	P	A	M	681
2264	CCT	CCC	CTT	ACC	CCA	CCC	AAC	ACT	TTG	GCA	CAG	CTA	GAG	GAA	GCC	TGC	2311
682	P	P	L	T	P	P	N	T	L	A	Q	L	E	E	A	C	697
2312	CGC	AGG	CTG	GCA	GAG	GTG	TCG	AAG	CCC	CAG	AAG	CAG	CGG	TGC	TGC	GTG	2359
698	R	R	L	A	E	V	S	K	P	Q	K	Q	R	C	C	V	713
2360	GCC	AGT	CAG	CAG	AGG	GAC	AGG	AAC	CAC	TCG	GCT	GCT	GGT	CAG	GCA	GGA	2407
714	A	S	Q	Q	R	D	R	N	H	S	A	A	G	Q	A	G	729
2408	GCC	TCA	CCC	TTC	GCC	AAC	CCA	AGC	CTG	GCT	CCA	GAA	GAT	CAC	AAA	GAG	2455
730	A	S	P	F	A	N	P	S	L	A	P	E	D	H	K	E	745
2456	CCA	AAG	AAA	CTG	GCA	AGT	GTC	CAC	GCG	CTC	CAG	GCC	AGT	GAG	CTG	GTT	2503
746	P	K	K	L	A	S	V	H	A	L	Q	A	S	E	L	V	761
2504	GTC	ACC	TAC	TTT	TTC	TGT	GGA	GAA	GAA	ATT	CCA	TAC	AGG	AGG	ATG	CTG	2551
762	V	T	Y	F	F	C	G	E	E	I	P	Y	R	R	M	L	777
2552	AAG	GCT	CAA	AGC	TTG	ACC	CTG	GGC	CAC	TTC	AAG	GAG	CAG	CTC	AGC	AAA	2599
778	K	A	Q	S	L	T	L	G	H	F	K	E	Q	L	S	K	793
2600	AAG	GGA	AAT	TAC	AGG	TAT	TAT	TTC	AAG	AAG	GCG	AGT	GAC	GAA	TTT	GCC	2647
794	K	G	N	Y	R	Y	Y	F	K	K	A	S	D	E	F	A	809
2648	TGC	GGA	CGA	GTT	TTT	GAG	GAG	ATC	TGG	GAC	GAC	GAG	ACA	GTG	CTC	CCC	2695
810	C	G	R	V	F	E	E	I	W	D	D	E	T	V	L	P	825
BamHI v																	
2696	ATG	TAC	GAA	GGC	AGG	ATC	CTG	GGC	AAA	GTG	GAG	AGG	ATC	GACTGAGCCTT	2745		
826	M	Y	E	G	R	I	L	G	K	V	E	R	I	D			839
2746	GGCCTCCTCGGCGTGCAACCTGGGCAAGCACCTCGGCGTGACCATGGAGCCGAAGCCCAGAG																2808
2809	ACCCTGTCTCAGGCCTACGCAACAGCCACGAAATATTCTGAAGGAAAATGAAACCAATTAAGA																2871
2872	AGACAAAGCCTAGGGAGGGAGCTGGCGCCTGGGCCTTCAGGAGGGCGGGGTATGTTGATCTTC																2934
2935	AGTCTCCAGGAGCCTGGGTACCGAGATGAGAAAGCCTGAACCTATTTATTAACATGACCACT																2997
2998	CTGGGCTATAGAAGATGCTCAGTGTGTTTGAGAGACTGACATACATAATAGATGACTTCCTAG																3060
3061	GGTTCTGAAATTCATAGACTAAGAGAAAACTGTGTATAGCTTGCCCCGACAGGAGTCCCTTACT																3123
3124	GATATTTATTGAACAGTCGATTCCCCCTACCCGCTCCCTACCCCCGCCCCGAGTTTATGC																3186
3187	TGCTTTAAACC -3'																3197

Abbau von β -Catenin
in SW480 Zellen

Interaktion mit
 β -Catenin
(β -Galactosidase Einheiten)

Conductin
Konstrukte



ja

nein

nein

nein

ja

220

0

0

44

490

16

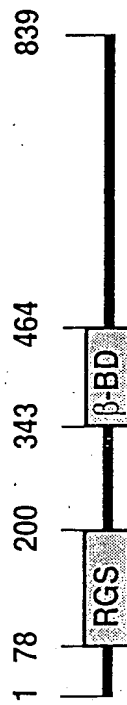
Abb. 4

72

Conductin Konstrukte

Interaktion mit APC-Fragmenten (β -Galactosidase Einheiten)

APC Fr. 1 APC Fr. 2



6 9

396



110 250



390 390

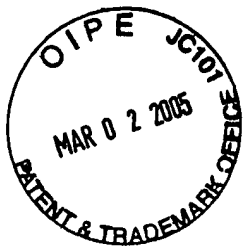


0 0



0 0

Abb. 5



Dr. F. Baumbach, Robert-Rössle-Str. 10, 13125 Berlin

Patentanwalt
Dr. F. Baumbach
Robert-Rössle-Str. 10

D-13125 Berlin

Certificate

I, Patent Attorney Dipl.-Chem. Dr. Friedrich Baumbach

declare that I am competent in the German and English languages and I do hereby certify, that the annexed document is the best of knowledge and belief true and correct translation of the

DE 197 38 205.3

Declared at Berlin

this 17 day of February 2005

Patent Attorney Dr. F. Baumbach

Tel.: +49-30-94892273
+49-30-94892274
Fax: +49-30-94892271

Bankverbindung : Berliner Sparkasse
BLZ: 10050000
Kto.-Nr. 1953238820

Max-Delbrück-Centrum für Molekulare Medizin

J. Behrens, W. Birchmeier

Agent for Diagnosing and Treating Tumor Illnesses

Summary

The invention relates to a new method for combating tumor illnesses through the use of molecular biological associations during formation of the tumor. The aim of the invention is to develop a method for controlling the regulation of beta -catenine in body cells.

The object of the invention is a new protein which bonds to β -catenine and the subsequent cytoplasmic decomposition of said protein. This protein has the amino-acid sequence according to figure 1 and is designated as **conductin**.

Agents for diagnosing and treating tumor illnesses are developed from the occurrence and the action of conductin in body cells.

The invention relates to a new way of combating tumor diseases by utilizing molecular biological relationships of the formation of tumors. In particular, it relates to a material for diagnosing tumor diseases and, based on this, a material for the treatment. It furthermore relates to the new protein, conductin, its mutants and variations as well as parts thereof, to the analogous cDNA sequences and to their use in the gene-therapeutic and pharmacological methods. Areas of the application are medicine and the pharmaceutical industry.

Cadherins and catenins form cell adhesion complexes, which are responsible in numerous tissues for the adhesion of cells to one another. The cadherins are trans-membrane proteins and produce the direct contact between adjacent cells. α -, β - and γ -catenin are cytoplasmic components, which connect the cadherines with the actin cytoskeleton. Aside from their function in cell adhesion, the catenins also play a decisive role in signal transduction processes. β -catenin in vertebrates and the homologous, segment polarity gene product, armadillo in drosophila, are stabilized by the Wnt/wingless signal path (Nusse, R., Cell 89, 321-323, 1997). This leads to an increase in the cytoplasmic fraction of these proteins which is not bound to cadherin, which thereupon could interact with HMG transcription factors of the LEF-1/TCF-family. As a result, β -catenin/armadillo is transported into the cell nucleus where, together with the LEF/TCF proteins, it binds to the DNA and activates certain genes (Behrens, J. et al., Nature 382, 638-642, 1997).

This signal pathway also plays an important role in the formation of tumors. In epithelial cells of the colon, the cytoplasmic pool of β -catenin is strictly regulated by the tumor suppressor gene product APC (Adenomatosis Polyposis Coli). Mutations of APC, such as those occurring in 80% of all colon cancers, lead to shortened forms of APC protein, which are no longer able to destabilize β -catenin. As a result, permanent complexes of β -catenin with the HMG transcription factor TCF-4, which are made responsible for the transformation of the cells, are found in these tumors. This theory is supported by the recent finding that, in tumors in which APC is not changed, mutations of β -catenin occur. These also lead to cytoplasmic stabilization of β -catenin and to an association with the LEF/TCF factors (Morin, P.J. et al., Science 275, 1787-1790).

The invention has the goal of finding a new way for preventing the formation of tumors. It is based on the objective of finding a method for controlling the regulation of β -catenin in cells of the body.

The object of the invention is a new protein, which binds to β -catenin and leads to its cytoplasmic degradation. This protein has the amino acid sequence of Figure 1 and was given the name of conductin.

The invention is based on our own realization that conductin binds to APC fragments over a β -catenin binding domain at β -catenin, and over a so-called RGS-domain (Regulator of G-protein Signaling). As a result, there is cytoplasmic degradation of β -catenin and in vertebrates, blockage of the Wnt/Wingless signal path. With that, it is clear that conductin is an important regulator of the β -catenin function and, in interaction with APC, contributes to the suppression of tumors.

Furthermore, as a consequence, the invention relates to a material for diagnosing tumor diseases, which is characterized in that the presence and the amount of conductin, its mutants and variations or its parts is detected in cells of the body. This detection can be carried out on the protein level with specific antibodies, especially with monoclonal antibodies.

Pursuant to the invention, the diagnosis of tumor diseases can also be carried out on the gene level. For this purpose,

- the gene which codes for conductin, its mutants and variations or parts thereof and/or
 - mRNA sequences, which are read off of these genes,
- are detected with selected primers and cDNA probes, which are derived from the gene sequence of conductin.

The inventive material for the treatment of tumor diseases contains substances which activate/reactivate the action of the conductin in the body. Above all, these are materials, which activate the gene promoter of conductin or materials, which increase the stability of the mRNA sequences derived from the conductin genes. Pursuant to the invention, the main objective of all these materials consists of increasing the

activity of the conductin in the cells of the body. For this purpose substances of low molecular weight, for example, come into consideration, which are found, for example by high throughput number screening.

The invention also comprises gene therapeutic materials, containing genes, which code for conductin, its mutants and variations of parts thereof, or mRNA sequences, which are read out of these genes.

Furthermore, the new protein conductin of Figure 1, its mutants and variations, as well as parts thereof are placed under protection.

Especially preferred partial sequences are the amino acids 78-200 (RGS), 343-464 (β -catenin-binding domain) and 782-832 (dishevelled homology region). Partial sequences of the Adenomatosis Poliposis Coli (APC), which are characterized by the amino acids 1464-1604, 1516-1595, 1690-1778, 1995-2083 as RGS-domains interaction sites, are also part of the extent of the protection.

Likewise the analogous cDNA sequences, especially the full cDNA sequence of the conductin (base pairs 1-3197) of Figure 2, as well as the partial sequences of the conductin of the nucleotide sequence 452-820 (RGS gene section), of the nucleotide sequence 1247-1612 (gene section of the β -catenin-binding domain) and of the nucleotide sequence 2564-2716 (gene section of the dishevelled homology region).

The invention is explained in greater detail by the following examples.

Conductin was identified by a yeast 2 hybrid screen as a β -catenin interaction partner. The complete cDNA was subsequently isolated and sequenced. The derived amino acid sequence of conductin is shown in Figure 1, the nucleotide sequence in Figure 2 and the gene comparison of the amino acid sequence and the nucleotide sequence is shown in Figure 3. Conductin consists 839 amino acids and has a molecular weight of 92.4 kDa. By a comparison of sequences, an RGS Domain (amino acids 78-200) and a domain (amino acids 782-832, dishevelled homology region), related to the protein dishevelled, were identified (Figures 1-3). The β -catenin-binding domain (amino acids 343-464) was discovered by interaction studies in the 2-hybrid system (Figure 4). It was observed that this domain is

sufficient and necessary for the binding to β -catenin (Figure 4). On the other hand, the RGS homology region and the dishevelled homology region do not participate. The interaction of conductin with β -catenin was also confirmed biochemically in co-immunoprecipitation experiments.

The effect of conductin on β -catenin was investigated in SW480 cells. In these cells, the tumor suppressor gene product APC is mutated, as a result of which there is an increase in the cytoplasmic and especially in the nuclear content of β -catenin. The introduction of conductin into these cells leads to a drastic degradation of β -catenin, as a result of which the cell is depleted of cytoplasmic β -catenin and of β -catenin in the cell nucleus (Figure 4). This effect on the content of β -catenin is equal in intensity to that of not-mutated APC, from which it can be concluded that conductin also acts as a tumor suppressor by regulating β -catenin. Moreover, it was shown that conductin also inhibits the Wnt/wingless signal path in *Xenopus* embryos due to its effect on β -catenin.

Furthermore, it was noted that conductin interacts directly with APC. APC fragments of amino acids 1464-1604, 1516-1595, 1690-1778 and 1995-2883 were identified as interaction sites for conductin. In conductin, the binding to APC takes place over the RGS domains; this region is sufficient and necessary for the interaction. The other domains in conductin do not participate (Figure 5).

Legends for the figures

Figure 1 Amino acid sequence of conductin

The conductin cDNA codes a protein of 839 amino acids with a calculated molecular weight of 92.4 kDa. The RGS domain (double underlining), the β -catenin binding domains (simple underlining) and the dishevelled homology region are emphasized by bold lettering.

Figure 2 Nucleotide sequence of conductin at position 1-3199

The sequence regions are marked as in Figure 1.

Figure 3 Comparison of amino amino acid sequence and nucleotide sequence of conductin

Figure 4 Analysis of the interaction of conductin and ist parts with β -catenin

The conductin protein and derived partial pieces are shown diagrammatically. The RGS-domain (RGS) and the β -catenin binding site (β -BD) are emphasized. The interaction with β -catenin was investigated in the yeast 2-hybrid assay and quantified as β -galactosidase units. It can be seen that the binding to the β -catenin is limited to the β -catenin binding site; the other parts of the protein do not contribute to this. The degradation of β -catenin in SW480 cells by conductin was analyzed after transient expression of the given proteins and immunofluorescence staining of β -catenin. Only partial pieces of conductin, which bind to β -catenin, lead to this degradation.

Figure 5 Analysis of the binding of conductin and its pieces to APC

The binding of the APC fragments of amino acid 1464-1604 (ApCfr.1) and 1516-1595 (APCfr. 2) to conductin and derived pieces of thereof were analyzed in a 2-hybrid assay and quantified as β -galactosidase units. The analysis reveals the only interaction of APC with the RGS-domain of conductin. Comparable results were derived from APC fragments of amino acid 1690-1778 and 1995-2883.

Claims

1. A material for the diagnosis of tumors, containing a substance, with which
 - conductin, its mutants and variations or parts thereof or
 - genes, which code for conductin, its mutants and variations or parts thereof or
 - mRNA sequences, which are read off of these genes,are detected.
2. The material for the diagnosis of tumors of claim 1, containing specific antibodies to conductin, its variations or mutants or parts thereof.
3. The material for the diagnosis of tumors of claims 1 and 2, wherein the specific antibodies are monoclonal antibodies.
4. The material for the diagnosis of tumors of claim 1, containing corresponding oligonucleotide primers and/or DNA probes for the detection of the genes and their mutations.
5. The material for the diagnosis of tumors of claim 1, containing corresponding oligonucleotide primers and/or DNA probes for the detection of RNA sequences.
6. A material for the treatment of tumors containing a substance, which activates/reactivates the action of conductin the body.
7. The material of claim 6, containing a substance, which activates the gene promoter of conductin.
8. The material of claim 6, containing a substance, which increases the stability of mRNA sequences.
9. The material of claim 6, containing a substance, which increases the activity of conductin.

10. Conductin, its variations, its mutants as well as parts thereof.
11. The conductin of claim 10, characterized by the amino acid sequence 1-839 of Figure 1, Figure 1 being part of this claim.
12. The partial sequence of conductin of claim 10, characterized by the amino acid sequence 78-200 (RGS-domain) of Figure 1.
13. The partial sequence of conductin of claim 10, characterized by the amino acid sequences 343-464 (β -catenin-binding domain).
14. The partial sequence of conductin of claim 10, characterized by the amino acid sequences 782-832 (dishevelled homology region) of Figure 1.
15. The partial sequences of Adenomatosis Poliposis Coli (APC), characterized by the amino acid sequences 1464-1604, 1516-1595, 1690-1778 and 1995-2083 as the interaction sites of RGS domains.
16. A cDNA sequence of conductin, its variations or mutants or parts thereof.
17. The cDNA sequence of the conductin of the nucleotide sequence 1-3197 of Figure 2, Figure 2 being a component of this claim.
18. The cDNA partial sequence of the conductin of the nucleotide sequence 452-820 (RGS gene section) of Figure 2.
19. The cDNA partial sequence of the conductin of the nucleotide sequence 1247-1612 (gene section of the β -catenin-binding domain) of Figure 2.
20. The cDNA partial sequence of the conductin of the nucleotide sequence 2564-2716 (gene section of the dishevelled homology region) of Figure 2.
21. Use of the conductin gene for the gene therapy of tumor diseases, wherein a vector is constructed with the conductin gene, a gene transfer subsequently

takes place in the human body and, with that, the activity of the conductin in the cells of the body is restored.

MSSAVLVTLPLDPSSSFREDAPRPPVPGEEGETPPCQPSVGKVQSTKMPVSSNARNED 60
 GLGEPEGRASPDSPLTRWTKSLHSLLGDDGAYLFRTEFLEREKCVDTLDFWFACNGFROM 120
NLKDTKTLRVAKAIYKRYIENNSVVSQOLKPKATKTYIRDGIKKQOIGSVMFDQAQTEIOA 180
VMEENAYQVFLTSDIYLEYVRSGGENTAYMSNGGLGSLKVLGCLPTLNEEEEWTCADLK 240
 CKLSPTVVGLSSKTLRATASVRSTETAENGFRSFKRSDPVNPHYVGSYVFAPATSANDS 300
 ELSSDALTDSDMSMTDSSVDGVPPYRMGSKKQLQREMHRSVKANGQVSLPHFFRTHRLPK 360
EMTPVEPAFAFAELISRLEKLELESRHSLEERLQOIREDEEKEGSEQALSSRDGAPVO 420
HPLALLPPAAMKRTHKPFWTTSPPGSSRPPAVNPLVWVAIAHGPAPPTTTTSTTTISSVI 480
 PFFRLGASCPVAACPLLGGKSFLTKQTKHVHHHYIHHHAVPKTKEEIEAEATQVRVRLC 540
 PGGTDYYCYCKSHPKAPEPLPGEQFCGSRGGTLPKRNAKGTEPGLALSARDGGMSSAA 600
 GGPQLPGEEDRSQDVWQWMLERQSKSKPHSAQSIRKSYPLESARAAPGERVSRHLL 660
 GASGHSRSVARAHFFTQDPAMPPLTPPNTLAQLEEACRRLAEVSKPQKORCCVASQQRDR 720
 NHSAGQAGASPFANPSLAPEDHKEPKKLASVHALQASELVVTTYFFCGEEIPYRRMLKAQ 780
 SLTLGHFKEQLSKKGNRYRYFFKKASDEFACGRVFEEIWDDETVLPMYEGRILGKVERID 839

Figure 1

AAATAAGCAGCCGTTTCGGGATGGATTTCGGGGCCACCCGAGGCCGAGGCGTCCGCTCCC 60
 CAAAGGAGAGCTTTGCTGTAAAAGAGAGGAGGCTCAGATGAGCCCCCTGCTGACTTAAGAG 120
 AGACCAAGCCGATTGCTGAGAGGAACTGGAAGAAGAAAAAGGAGGAGGAGGAAAAAAG 180
 CAAAACAAAATCCAAACTCAGTGAGACGCTCTCCCTCACCATGAGTAGCGCGTGTAGT 240
 GACTCTCCTTCCAGATCCAGCAGCAGCTTCCGCGAGGATGCTCCGCGGCCCCCGGTTCC 300
 GGGAGAAGAAGGGGAGACCCACCGTGTGAGCCTAGTGTGGGCAAGGTCCAGTCCACCAA 360
 ACCTATGCCCGTTTCCTCTAATGCTAGGCGGAATGAAGATGGACTGGGGGAGCCCGAGGG 420
 GCGGGCCTCCCCGATTCCCTTTGACCAGGTGGACCAAGTCTTTACACTCCTTGTGGG 480
TGACCAGGATGGTGCATACCTCTTCCCGACTTTCCCTGGAGAGGGAGAAATGTGTGGATAC 540
GCTGGACTTCTGGTTTGGCTTGTAAATGGTTTACGGCAGATGAACCTGAAGCATACCAAAC 600
TTTGGCAGTGGCCAAAGCAATCTATAAGAGGTACATTGACAACAACAGCGTTGTCTCCAA 660
GCAGCTGAAGCCCCCACCAGACCTACATACGAGATGGCATCAAGAAGCAACAGATCGG 720
CTCGGTCTATGTTGACCAGGCACAGACCCGAGATCCAGGCAGTATGGAGGAAAAATGCCA 780
CCAGGTGTTCTTGACTTCTGACATTTACCTGCAATATGTCAGGAGTGGGGGGGAAACAC 840
 AGCTTACATGAGTAACGGGGGACTGGGGAGCCTAAGGTCCTATGTGGCTACCTCCCCAC 900
 CTTGAATGAAGAAGAGGAGTGGACGTGTGCCGACCTCAAGTGCAAACTCTCACCCACCGT 960
 GGTGGCTTGTCCAGCAAACTCTTCGGGCCACCGCGAGTGTGAGATCCACGGAAACAGC 1020
 TGAAACCGGATTGAGGTCTTCAAGAGAAGCGACCCAGTCAATCCTTATCAGTAGGTTC 1080
 CGGCTATGTCTTGCACCAGCCACCACTGCCAACGACAGCGAGTTATCCAGCGACGCACT 1140
 GACCGACGATTCCATGTCCATGACGGACAGTAGCGTAGATGGAGTCCCTCCTTACCGCAT 1200
 GGGGAGTAAGAAAACAACCTCCAGAGAGAGATGCATCGCAGTGTGAAGGCCAATGGCCAAGT 1260
 GTCTCTACCTCATTTTCCGAGAACCACCGCCTGCCCAAGGAGATGACGCCTGTGGAACC 1320
 TGCTGCCTTCGCGCGCGAGCTCATCTCCAGGCTGCAGAACTGAAACTGGAGCTGGAAAG 1380
 CCGCCATAGTCTGGAGGACGGGCTGCAGCAGATCCGGGAGGATGAAGAAAAGGAGGGGTC 1440
 TGAGCAGGCCCTGAGCTCAGCGGATGGAGCACCGGTCCAGCACCCCTGGCCCTCCTACC 1500
 TCCGGCAGCTATGAAGAGGACCCACAACCATTTTGGACGACCACTCTCCAGGGTCTCTC 1560
 AAGACCCCGGCTGTCAATCCCTTGTGTGGGTGCTATAGCCCACGGTCCCGCTCCCC 1620
 GACCACCACCACCAGCACCACCACCATCAGCAGTGTCTATCCCTTCTTTGACTGGGGGC 1680
 AAGCTGCCCCGTGGCTGCTTGCCTCCCTTGGAGGCAAGAGCTTCTTGACCAAAACAGAC 1740
 GACGAAGCAGCTTCAACCACTACATCCACCACCACGCGCTCCCCAAGACCAAGGAGGA 1800
 GATCGAGGCAGAAAGCCACACAGAGAGTCCGCTGCCTCTGTCTGGGGGAACAGATTATTA 1860
 TTGCTACTCCAAATGCAAAAGCCACCCGAAGGCTCCAGAGCCCTGCCTGGGGAGCAGTT 1920
 TTGTGGCAGCAGAGGTGGTACCTTGCCAAAACGGAATGCAAAAGGGCACCGAACCGGGTCT 1980
 TGCATGTGCGCCAGGGATGGAGGGATGTCCAGTGCAGCGGGGGGCCCCAGCTTCTTGG 2040
 GGAAGAAGGAGACCGGTACAGGATGTCTGGCAGTGGATGTAGAGAGTGAGCGGCAGAG 2100
 CAAGTCCAAGCCCCATAGTGCCCAAGCATAAGAAAGAGCTACCCATTGGAGTCTGCCCG 2160
 TGGGCCCCCAGGAGAACGAGTCAGCCGGCACCATCTGTTGGGGGCCAGCGGACACTCCCG 2220
 CTCGGTGGCCCGGGCTCACCCATTTACCCAGGACCTGCAATGCCTCCCTTACCCACC 2280
 CAACACTTTGGCACAGCTAGAGGAAGCCTGCCGACGGCTGGCAGAGGTGTGGAAGCCCCA 2340
 GAAGCAGCGGTGCTGCGTGGCCAGTCAGCAGAGGGACAGGAACCACTCGGCTGCTGGTCA 2400
 GGCAGGAGCCTCACCTTCGCCAACCCAAGCCTGGCTCCAGAAGATCACAAAGAGCCAA 2460
 GAACTGGCAAGTGTCCACGCGCTCCAGGCCAGTGAGCTGTTGTACCTACTTTTTCTG 2520
 TGGAGAAGAAATTCATACAGGAGGATGCTGAAGGCTCAAAGCTTGACCTGGGCCACTT 2580
 CAAGGAGCAGCTCAGCAAAAAGGGAATTAAGGTATTATTTCAGAAGGCGAGTGACGA 2640
 ATTTGCCCTGCGGACGAGTTTTTTGAGGAGATCTGGGACGACGACAGTGTCTCCCATGTA 2700
 CGAAGGCAGGATCCTGGGCAAGTGGAGAGGATCGACTGAGCCTTGGCCTCCTCGGCGTG 2760
 CAACCTGGGCAAGCACCTCGGCGTGCACCATGGAGCCGAAGCCCAGAGACCTGTCTCAG 2820
 GCCTACGCAACAGCCACGAAATATTCTGAAGGAAAATGAAACCAATTAAAGAAGACAAAGC 2880
 CTAGGGAGGGACTGGCGCTGGGCTTCAGGAGGGCGGGGTATGTTGATCTTCAGTCTC 2940
 CAGGAGCCTGGGTACCGAGATGAGAAAGCCTGAACATTTATTAAACATGACCACTCTG 3000
 BGCTATAGAAGATGCTCAGTGTGTTGAGAGACTGACATACATAATAGATGACTTCCTAG 3060
 GGTCTGAAATTATAGACTAAGAGAAAACGTGTATAGCTTGCCCGCACAGGAGTCTT 3120
 ACTGATATTTATTGAACAGTCGATTCCCCCTACCCGCTCCCTACCCCGCGCCCGGAGT 3180
 ITATGCTGCTTTAAACC 3197

Figure 2

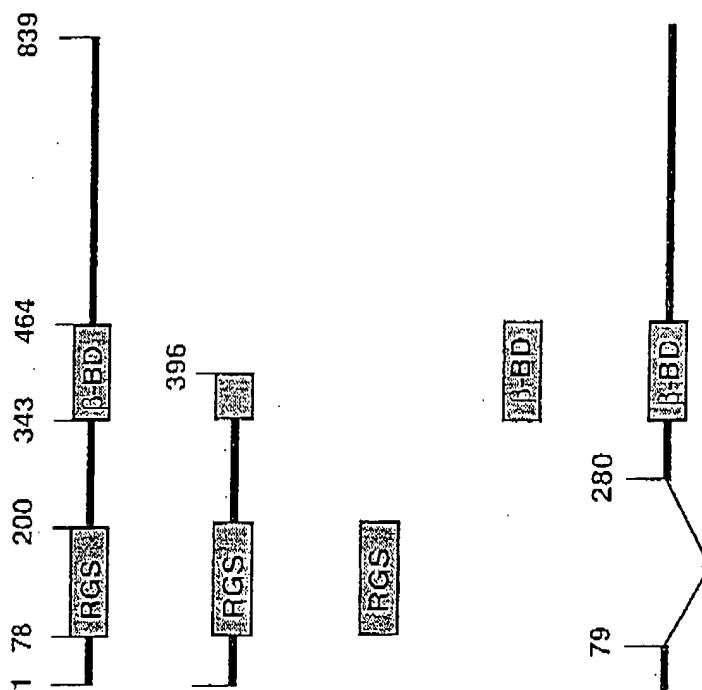
1	5'	AAATAAGCAGCCGTTCCGCGATGGATTTCGGGGCCACCCGAGGCGCGAGGCGTCCGCTCCCCAAAGG	66
67		AGAGCTTTGCTGTAAAAGAGAGGAGGCTCACATGAGCCCTGCTGACTTAAGAGAGACCAAGC	129
130		CGATTGCTGAGAGGAACTGGAAGAAGAAAAAGGAGGAGGAGGGAAAAAAGCAAACAAAATC	192
193		CAAACTCAGTGAGAGCGCTCTCCCTCACCATG AGT AGC GCC GTG TTA GTG ACT CTC	247
1		M S S A V L V T L	9
248		CTT CCA GAT CCC AGC AGC AGC TTC CGC GAG GAT GCT CCG CGG CCC CCG	295
10		L P D P S S S F R E D A P R P P	25
296		GTT CCG GGA GAA GAA GGG GAG ACC CCA CCG TGT CAG CCT AGT GTG GGC	343
26		V P G E E G E T P P C Q P S V G	41
344		AAG GTC CAG TCC ACC AAA CCT ATG CCC GTT TCC TCT AAT GCT AGG CGG	391
42		K V Q S T K P M P V S S N A R R	57
392		AAT GAA GAT GGA CTG GGG GAG CCC GAG GGG CGG GCC TCC CCC GAT TCC	439
58		N E D G L G E P E G R A S P D S	73
440		CCT TTG ACC AGG TGG ACC AAG TCT TTA CAC TCC TTG TTG GGT GAC CAG	487
74		P L T R W T K S L H S L L G D Q	89
488		GAT GGT GCA TAC CTC TTC CGG ACT TTC CTG GAG AGG GAG AAA TGT GTG	535
90		D G A Y L F R T F L E R E K C V	105
536		GAT ACG CTG GAC TTC TGG TTT GCT TGT AAT GGG TTC AGG CAG ATG AAC	583
106		D T L D F W F A C N G F R O M N	121
584		CTG AAG GAT ACC AAA ACT TTG CGA GTG GCC AAA GCA ATC TAT AAG AGG	631
122		L K D T K T L R V A K A I Y K R	137
632		TAC ATT GAG AAC AAC AGC GTT GTC TCC AAG CAG CTG AAG CCC GCC ACC	679
138		Y I E N N S V V S K O L K P A T	153
680		AAG ACC TAC ATA CGA GAT GGC ATC AAG AAG CAA CAG ATC GGC TCG GTC	727
154		K T Y I R D G I K K O O I G S V	169
728		ATG TTT GAC CAG GCA CAG ACC GAG ATC CAG GCA GTG ATG GAG GAA AAT	775
170		M F D Q A Q T E I O A V M E E N	185
776		GCC TAC CAG GTG TTC TTG ACT TCT GAC ATT TAC CTG GAA TAT GTG AGG	823
186		A Y Q V F L T S D I Y L E Y V R	201
824		AGT GGG GGG GAA AAC ACA GCT TAC ATG AGT AAC GGG GGA CTG GGG AGC	871
202		S G G E N T A Y M S N G G L G S	217
872		CTA AAG GTC TTA TGT GGC TAC CTC CCC ACC TTG AAT GAA GAA GAG GAG	919
218		L K V L C G Y L P T L N E E E E	233
920		TGG ACG TGT GCC GAC CTC AAG TGC AAA CTC TCA CCC ACC GTG GTT GGC	967
234		W T C A D L K C K L S P T V V G	249
968		TTG TCC AGC AAA ACT CTT CGG GCC ACC GCG AGT GTG AGA TCC ACG GAA	1015
250		L S S K T L R A T A S V R S T E	265
1016		ACA GCT GAA AAC GGA TTC AGG TCC TCC AAG AGA AGC CCA GTC AAT	1063
266		T A E N G F R S F K R S D P V N	281
1064		CCT TAT CAC GTA GGT TCC GGC TAT GTC TTT GCA CCA GCC ACC AGT GCC	1111
282		P Y H V G S G Y V F A P A T S A	297
1112		AAC GAC AGC GAG TTA TCC AGC GAC GCA CTG ACC GAC GAT TCC ATG TCC	1159
298		N D S E L S S D A L T D D S M S	313
1160		ATG ACG GAC AGT AGC GTA GAT GGA GTC CCT CCT TAC CGC ATG GGG AGT	1207
314		M T D S S V D G V P P Y R M G S	329
1208		AAG AAA CAA CTC CAG AGA GAG ATG CAT CGC AGT GTG AAG GCC AAT GGC	1255
330		K K Q L Q R E M H R S V K A N G	345
1256		CAA GTG TCT CTA CCT CAT TTT CCG AGA ACC CAC CGC CTG CCC AAG GAG	1303
346		Q V S L P H F P R T H R L P K E	361
1304		ATG ACG CCT GTG GAA CCT GCT GCC TTC GCC GCC GAG CTC ATC TCC AGG	1351
362		M T P V E P A A F A A E L I S R	377
1352		CTG GAG AAA CTG AAA CTG GAG CTG GAA AGC CGC CAT AGT CTG GAG GAG	1399
378		L E K L K L E L E S R H S L E E	393
		<i>PstI</i> V	
1400		CGG CTG CAG CAG ATC CGG GAG GAT GAA GAA AAG GAG GGG TCT GAG CAG	1447
394		R L Q Q I R E D E E K E G S E Q	409
1448		GCC CTG AGC TCA CGG GAT GGA GCA CCG GTC CAG CAC CCC CTG GCC CTC	1495
410		A L S S R D G A P V Q H P L A L	425
1496		CTA CCT CCG GCA GCT ATG AAG AGG ACC CAC AAA CCA TTT TGG ACG ACC	1543
426		L P P A A M K R T H K P F W T T	441

Figure 3

Interaction with β -catenin
(β -galactosidase unit)

Breakdown of β -catenin
in SW480 cells

Conductin
Constructs



yes

no

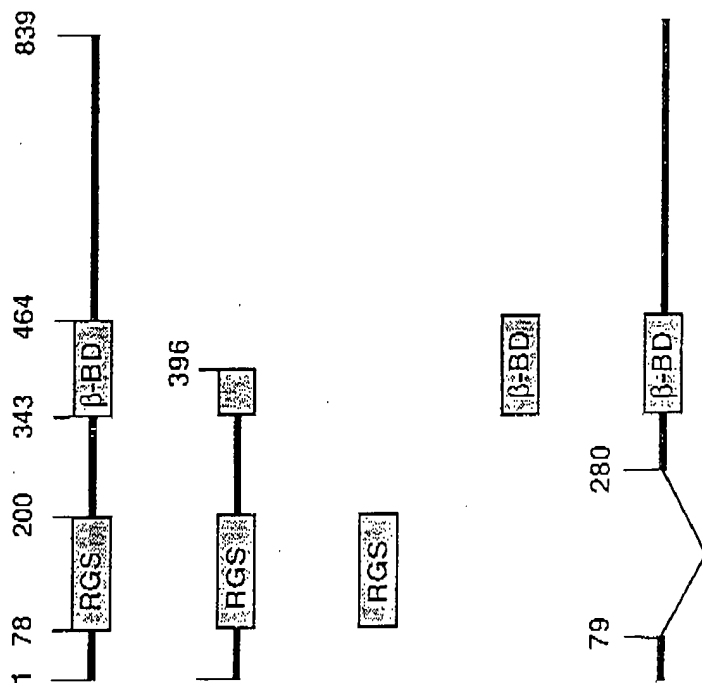
no

no

yes

Figure 4

Conductin Constructs



Interaction with
APC - fragments
(β -Galactosidase units)

APC Fr. 1 APC Fr. 2

6 9

110 250

390 390

0 0

0 0

Figure 5